

**PRODUCTION OF COENZYME Q**

Patent Number: JP60075294  
Publication date: 1985-04-27  
Inventor(s): SUZUKI TAKAO; others: 01  
Applicant(s): NISSHIN SEIFUN KK  
Requested Patent: ☐ JP60075294  
Application Number: JP19840049302 19840316  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12P7/66  
EC Classification:  
Equivalents: JP1437925C, JP62046156B

---

**Abstract**

---

**PURPOSE:** To provide a commercially practicable process for the production of a coenzyme Q having high purity, by treating a reduced coenzyme Q with a porous synthetic resin, and oxidizing the treated coenzyme Q.  
**CONSTITUTION:** A reduced coenzyme Q is treated with a porous synthetic resin to remove the impurities, and the treated reduced coenzyme Q is oxidized to obtain the objective coenzyme Q. A high-purity coenzyme Q10 can be produced by crystallizing a fraction of the above refined coenzyme Q having a melting point of higher than room temperature, e.g. in acetone. The treatment with the porous synthetic resin is carried out in the presence of a solvent. A polar solvent such as methanol is used for the nonpolar porous synthetic resin such as styrene divinylbenzene copolymer, etc. to effect the adsorption of a rather nonpolar impurities. On the contrary, in the case of a polar porous synthetic resin such as acrylate polymer, a nonpolar solvent such as hexane is used to effect the development and the elution.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-75294

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)4月27日

C 12 P 7/66

6760-4B

審査請求 有 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 補酵素Qの製造法

⑯ 特 願 昭59-49302

⑰ 出 願 昭52(1977)4月21日

⑱ 特 願 昭52-45176の分割

⑲ 発 明 者 鈴木 隆 夫 東京都練馬区旭町2-21-6

⑲ 発 明 者 福島 英 夫 埼玉県入間郡鶴ヶ島町大字上新田204の2

⑲ 出 願 人 日清製粉株式会社 東京都中央区日本橋小網町19番12号

## 明 細 書

1. 発明の名称 補酵素Qの製造法

2. 特許請求の範囲

- 1) 還元型補酵素Qを多孔性合成樹脂で処理し、次いで処理した還元型補酵素Qを酸化することを特徴とする補酵素Qの製造法。
- 2) 多孔性合成樹脂が非極性多孔性合成樹脂である場合極性溶媒を使用する特許請求の範囲第1項記載の補酵素Qの製造法。
- 3) 多孔性合成樹脂が極性多孔性合成樹脂である場合非極性溶媒を使用する特許請求の範囲第1項記載の補酵素Qの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、還元型補酵素Qから補酵素Qを製造する方法に関する。

補酵素Qは生体内では電子伝達系に参与し、各種疾病に対して優れた薬理効果を示す物質である。粗製の補酵素Qは合成、発酵あるいは天然物より得られるが、高純度の補酵素Qに精製することは、それ自体が非常に不安定な化合物

である上に、各々類似した夾雑物を含むために極めて困難であつた。従来、補酵素Qの精製方法としてはシリカゲル、アルミナ、フロリジルなどの無機物を用いたクロマトグラフィーが知られている。この無機吸着剤を用いたクロマトグラフィーは類似した夾雑物を含む目的物に対しては効果の大きい精製手段ではあるが、工業的には無機吸着剤は比重が大きいため操作上困難な点が多く、また反復使用の点でも問題がある。またポリエチレン粉末を吸着剤とする方法も知られていたが、それらは脱固後が小さく工業的精製手段とはなり得なかつた。

本発明者らは商業的に実施し得る高純度の補酵素Qを製造する方法につき種々検討した結果本発明を完成するに至つた。

すなわち、本発明は、予め原料物質たる還元型補酵素Qを多孔性合成樹脂で処理して夾雑物を除去し次いで処理した還元型補酵素Qを酸化する補酵素Qの製造法である。

本発明に用いられる多孔性合成樹脂としては

例えばステレン-ジビニルベンゼン共重合体(アンバーライト XAD-2 (ローム・アンド・ハース社製)、アンバーライト XAD-4 (ローム・アンド・ハース社製)、ハイポラスポリマー HP (三菱化成工業株式会社製))のような非極性合成樹脂、ポリアクリルエステル[アンバーライト XAD-7 (ローム・アンド・ハース社製)、アンバーライト XAD-8 (ローム・アンド・ハース社製)]、スルホキシド[アンバーライト XAD-9 (ローム・アンド・ハース社製)]、アミド(Amide)[アンバーライト XAD-11 (ローム・アンド・ハース社製)]のような極性合成樹脂が挙げられる。またこれらの多孔性合成樹脂は、樹脂の単位表面積が大きいほど好適であるが、通常  $100 \text{ m}^2/\text{g}$  以上、好ましくは  $400 \text{ m}^2/\text{g}$  以上のものである。多孔性合成樹脂の孔径は処理する化合物の分子の大きさの約3倍以上、通常  $50 \text{ \AA}$  以上が好適であり、且つ平均孔径が大きいほど好ましい結果が得られる。

本発明方法をさらに詳しく説明すると合成、

る還元物の場合と同様に多孔性合成樹脂でクロマトグラフィーを行い、次いでケン化した後酸化工程に付せばよい。

本発明において使用される展出・溶出溶媒としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、ロープロパノール、アセトン、メチルエチルケトン、イソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、メチルセロソルブ、酢酸エテル、ベンゼン、トルエン、ヘキサン、石油エーテル、石油ベンジン、イソペンタン、四塩化炭素、クロロホルム、ジメチルホルムアミド、水等の工業的に安価な極性または非極性の溶媒を単独であるいは種々の割合に混合した混合溶媒として使用することができる。溶媒を使用するに際し例えばステレン-ジビニルベンゼン共重合体のような非極性多孔性合成樹脂に対してはメタノールのような極性溶媒を用いて、比較的非極性の夾雑物を吸着させ、次にメタノールにアセトンを加えて、極性を弱めた混合溶媒で展開し、目的物質を溶出させる。またアク

発酵および天然物から抽出したものをそのままあるいは必要に応じて一般的な還元剤例えば、ハイドロサルファイトソーダ、水素化銅素ナトリウム等を添加して常法により還元型補酵素Qとなしてから、前記多孔性合成樹脂を通常の溶媒によるクロマトグラフィーの担体として使用し、流出液中の還元型補酵素Q区分を濃縮する。次に得られた還元型補酵素Qを常法の穏和な酸化剤で処理して補酵素Qを製造する。次に、得られた精製補酵素Qのうち室温以上の融点を有するものは一般的な精製手段である結晶化、例えばアセトン中で結晶化することによつて高純度の補酵素Q<sub>10</sub>を得ることができる。なお、本発明に係る還元型補酵素Qとしては、補酵素Qの還元物であるハイドロキノン体の外、ハイドロキノン後の水酸基がアセチル化されたハイドロキノン・モノエステル、ハイドロキノン・ジ・エステル等が挙げられる。

還元型補酵素Qが補酵素Qモノ・エステルあるいはジ・エステルの場合は、補酵素Qの単な

リル酸エステル重合体のような極性多孔性合成樹脂に対しては逆にヘキサンのような非極性溶媒により展開溶出させる。溶出操作が終了した樹脂は夾雑物が全く吸着しない溶媒で洗浄すれば再使用が可能である。洗浄溶媒はアセトン、イソプロピルエーテル、ベンゼン等の比較的非極性有機溶媒が効果的である。

本発明において特に好ましい方法としては多孔性合成樹脂として非極性合成樹脂を用い、溶出溶媒として水、アルコール類、ケトン類、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリルなどの極性溶媒を使用して展開する方法が好適である。この場合使用される極性溶媒としては一般には炭素数1~5のアルコール類、炭素数3~6のケトン類を基本とする混合溶媒、例えばメタノールと水、メタノールとアセトン、メタノールとローヘキサン、アセトンと水などの組合せが工業的に有利である。またその他の種々の組合せ、又は単一溶媒の使用が可能なのは勿論である。

本発明方法は一般に次の順序によつて実施される。

塔長径比1.0以上のカラムに水を満たし、自然広降によつて目的物の3倍(容積/重量)以上の多孔性合成樹脂を充填する。次に還元型補酵素Qが溶出しない溶媒でカラムを置換したのち、処理する還元型補酵素Qをカラムの上部から流動させる。クロマトグラフィーは一般の方法と同様に行うが、還元型補酵素Qの結晶が析出する場合は必要に応じてカラムを加熱してもよい。流出液は区分して採取し目的物質を含む溶出区分を濃縮すれば目的物質が得られる。次にアセトン、ベンゼン、エーテル、エステル類などの溶出力の大きい溶剤によりカラムを洗浄し、吸着物質を除き、溶剤でカラムを置換することにより再び精製クロマトグラフィーを実施することができる。

また本発明方法に使用される多孔性合成樹脂は無機吸着剤、イオン交換樹脂などと異なり化学的に不活性であることから、溶出力の大きい

溶剤例えばアセトンなどにより吸着物を溶出させることによつて容易にしかも完全に元の状態に再生されるので工業的にきわめて有利である。

本発明は従来法と比較し次のごとく著しく優れた効果を有するものである。即ち分離選択性が極めて大きいこと、また多孔性合成樹脂に対する夾雑物の吸着量が極めて大きく、且つ無機吸着剤と異なり、吸着点がないため分解が起らず、多孔性合成樹脂処理操作中における損失が全くなく、回収率が著しく高いこと、多孔性合成樹脂を繰り返し使用することができること、無機物の吸着剤と炭化水素類、エーテル類などの疎水性溶媒を用いる従来方法と異なり、静電気等による火災の危険性の少ないより安全な溶媒の選択が可能となつたこと、簡単な精製法で高純度の補酵素Qが得られること等の経済性および実用性共に満足し得るものである。

次に本発明の実施例を示すが本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

ハイポラスポリマーHP-20(比表面積7180  $\text{cm}^2/\text{g}$ 、細孔容積1077  $\text{ml}/\text{g}$ 、4.0メッシュ、三菱化成工業株式会社製)200  $\text{ml}$ をガラス製カラム( $\phi 45\text{mm} \times 300\text{mm}$ )に充填し、アセトン:メタノール(3:7)混合液にて逆流した後静置する。これにイソデカブレンオールと2,3-ジメトキシ-5-メチル-ハイドロキノンを三弗化ホウ素・エーテル錯体触媒の存在下に縮合して得た2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンニルハイドロキノ(還元型補酵素 $Q_{10}$ )を含む油脂状物30  $\text{g}$ (純度48%)を前記混合液30  $\text{ml}$ で攪拌乳濁させて充填カラム中を流動させる。次いで同一混合液で流出させる。流出液は約100  $\text{ml}$ づつ区分し、それぞれの区分液の極微量についてシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行つて2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンニルハイドロキノンを含む区分を集合させ、溶媒を減圧濃縮によつて留去する。得られた処理物をイソプロピルエーテル400

$\text{ml}$ に溶解させ、5%水酸化カリウム水20  $\text{ml}$ を加え、室温で攪拌下に30分間空気を導入して酸化する。次いでイソプロピルエーテル層を水洗し、溶媒を乾燥してから減圧留去すると補酵素 $Q_{10}$ を含む赤色油状物1.61  $\text{g}$ が得られる。得られた赤色油状物を再度多孔性合成樹脂で処理した後薄層クロマトグラフィーを行うと純度96%の補酵素 $Q_{10}$  1.39  $\text{g}$ が得られた。

#### 実施例 2

ハイポラスポリマーHP-20(40メッシュ、三菱化成工業株式会社製)200  $\text{ml}$ を45  $\text{mm}$   $\phi$ のカラムに充填しアセトン:メタノール(2:8)混合液で満たした。次にソラネオールと2,3-ジメトキシ-5-メチル-ハイドロキノンを塩化亜鉛触媒の存在下に縮合させて得た2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-ノナブレンニルハイドロキノ(還元型補酵素 $Q_9$ )を含む油脂30  $\text{g}$ (純度46%)を前記混合液30  $\text{ml}$ に添加して攪拌乳濁させてから充填カラム中を流動させる。次いで同一混合液で流出させる。次に

2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-ノナブレニルヒドロキノンを含む区分を減圧濃縮して得た処理物をイソプロピルエーテル400mlに溶解させ二酸化鉛36gを添加し4時間撈拌する。酸化鉛を尹別したのち減圧濃縮すると補酵素Q<sub>9</sub>を含む赤色油状物16.4gが得られる。

#### 実施例 3

*Pseudomonas* 属菌 [*Pseudomonas denitrificans*, NRRL B-1665 (Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604)] を培養し、遠心分離により集菌して得た湿菌体ペーストを水酸化ナトリウムおよびピロガロールの存在下に、ヘキサン：メタノール混合液で加熱抽出する。次にヘキサン層を5%ヒドロサルファイトソーダ水で洗浄し、さらに水洗して芒硝で脱水後減圧濃縮する。次いで濃縮物のアセトン可溶部を取り、アセトンを留去して得た2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレニルヒドロキノン(還元型補酵素Q<sub>10</sub>)を含む油状物30g(純度55%)を以下実施例1

キシ-5-メチル-6-デカブレニルヒドロキノン-4-モノアセテートを含む区分を集合させ、溶媒を減圧濃縮によつて留去する。得られた油状物20gをイソプロピルエーテル150mlに溶解し、これに10%苛性カリを含むメタノール10mlを加え30分間放置後、水30mlを加え、室温で撈拌下に30分間空気を導入して酸化する。次にイソプロピルエーテル層を水洗し溶媒を減圧留去すると補酵素Q<sub>10</sub>を含む赤色油状物8.6gが得られる。

と同様に処理し補酵素Q<sub>10</sub>を含む赤色油状物19.2gを得る

#### 実施例 4

ハイポークスポリマーHP-40(比表面積704.7 m<sup>2</sup>/g、細孔容積0.687 ml/g、40メッシュ、三菱化成工業株式会社製)200mlをガラス製円柱(φ45mm×300mm)に流入し、アセトン：メタノール(3:7)混合液にて逆洗し、静置した。次に充填カラム上にイソデカブレノールと2,3-ジメトキシ-5-メチル-ヒドロキノン-4-モノアセテートとを三弗化ホウ素-エーテル錯体触媒により縮合することによつて製造した2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレニルヒドロキノン-4-モノアセテート(還元型補酵素Q<sub>10</sub>のエステル)を含む油脂20g(純度38%)を前記混合液20mlで撈拌乳濁させてから仕込む。次いで同一混合液で流出させる。流出液は約100mlずつ区分し、それぞれの区分液の極微小量についてシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行つて2,3-ジメト